AUS DER BAYERISCHEN LANDESIMPFANSTALT

MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. A. Herrlich

Die vakzinale Gewebeallergie und ihre passive Übertragbarkeit ('zellulärer Transfer') im Tierversuch

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

HEIDE TRAUZETTEL

aus München

1967

AUS DER BAYERISCHEN LANDESIMPFANSTALT

MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. A. Herrlich

Die vakzinale Gewebeallergie und ihre passive Übertragbarkeit ('zellulärer Transfer') im Tierversuch

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

HEIDE TRAUZETTEL

aus München

1967

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der

Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Stickl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Eyer

Dekan: Prof. Dr. M. Kiese

Tag der mündlichen Prüfung: 7. 3. 1967

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung und Problemstellung	2
II. Material und Methoden	9
1. Tiere	9
2. Vakzine-Virus	9
3. Vakzine-Antigen	9
4. Impfungen	10
5. Leukozytengewinnung	10
III. Beschreibung der Versuche	13
A. Versuche zur generalisierten Übertragung der Reaktion vom verzögerten Typ durch intravenöse und intraperitoneale Injektion von Leukozyten und von Milzhomogenaten Vakzine-immuner Kaninchen	13
B. Die lokale Übertragbarkeit der geweblichen Vakzine-immunität	15
1. Die Immuncytolyse als Kriterium für die "gewebliche Immunität" von isolierten Blutzellen	15
2. Versuche zur Übertragung der verzögerten Reaktion durch s. c. Injektion von Leukozyten mit Vakzine-Virus oder mit Vakzine-Antigen immunisierter Kaninchen in die Haut ungeimpfter Versuchstiere	21
3. Virusadsorbtion an "sensibilisierte" Leukozyten	35
IV. Diskussion der Ergebnisse	40
V. Zusammenfassung	49
VI. Literaturverzeichnis	51

I. Einleitung und Problemstellung

Bei der Pockenschutzimpfung wie auch nach parenteralem Kontakt mit verschiedenen antigenen Stoffen kommt es zur Entstehung einer geweblichen Reaktionsbereitschaft und zur Produktion von Serumantikörpern. Der erneute Kontakt mit dem induzierenden Antigen führt im Körper sowohl zu einer Sofortreaktion als auch in den meisten Fällen zu einer an Zellen und Gewebe gebundenen verzögerten Reaktion. Die Hautreaktion ist bei der ersteren histologisch vorwiegend vasculär und enthält polymorphkernige Zellen, wohingegen bei der verzögerten, vorwiegend proliferativen Reaktion die mononuclearen Leukozyten vorherrschen. Die Sofortreaktion (z. B. die anaphylaktische Reaktion und das Arthus Phänomen) tritt schon Minuten nach der wiederholten Applikation mit dem Maximum nach einigen Stunden auf, während die verzögerte Reaktion zur Ausbildung einer sichtbaren Reaktion mehrere Stunden benötigt und ihr Maximum oft erst nach mehreren Tagen erreicht, wobei Spezies- und Antigenunterschiede die entscheidende Rolle spielen.

Daß die Reaktion vom verzögerten Typ nicht an humorale Antiköper gebunden ist, zeigen Versuche, bei denen Serum immuner Tiere auf unbehandelte übertragen wurde (LAWRENCE 1959). Bei der Prüfung mit dem homologen Antigen trat keine verzögerte Reaktion auf. Dagegen ist es gelungen die verzögerte Reaktionsbereitschaft mit Hilfe von Zellen (weiße Blutzellen, Lymphknoten-, Milz- und Peritonealexudat-

zellen), die von immunisierten Tieren stammten, auf normale Tiere zu übertragen. Dies gelang LANDSTEINER und CHASE 1942 mit Peritonealexsudatzellen, die mit Picrylchloriden sensibilisiert waren. CHASE (1945) sensibilisierte Meerschweinchen durch subcutane Injektion von getöteten Tubercelbakterien (Typ humanus). 5 - 9 Wochen später wurde die Bildung von Peritonealexsudat durch i. p. Injektion von Paraffin-Öl angeregt und 48 Stunden danach wurden Peritonealzellen gewonnen. Diese wurden normalen Meerschweinchen entweder i. p. oder i. v. injiziert. Die Prüfung der verzögerten Reaktion, die ihren Höhepunkt nach 20 - 36 Stunden entwickelte, erfolgte durch Alttuberkulin. Die Übertragung der verzögerten Reaktion gegenüber Tuberculin gelang auch mit weißen Blutzellen tuberculöser Menschen auf tuberculinnegative Personen (LAWRENCE 1949). Die Verhältnisse bei der verzögerten Reaktion wurden in der folgenden Zeit besonders bei der Tuberkulose erforscht und werden nach diesen Versuchen auch allgemein Tuberculintypreaktion, "tuberculin like reaction" oder "allergy of the tuberculin type" genannt. In den letzten Jahren haben sich aber Bezeichnungen wie "delayed hypersensitivity" und "delayed type of reaction" im Deutschen entsprechend "Reaktionsbereitschaft vom verzögerten Typ" (RvT) durchgesetzt. Da im Einzelnen sich abspielende Vorgänge in Zellen und Geweben noch nicht ausreichend bekannt sind, wird mit diesen Bezeichnungen am wenigsten späteren Erkenntnissen vorgegriffen. Im weiteren werden gleichsinnig für denselben Vorgang auch "Gewebeimmunität" und "Gewebeallergie" verwendet, obwohl diese Ausdrückeschon öfters Kritik fanden; sie haben sich jedoch bei uns eingebürgert. Dabei handelt es sich

bei der Gewebeimmunität und Gewebeallergie bei der Tuberkulose, wie auch bei der Pockenschutzimpfung um parallele, vielleicht sogar identische Vorgänge.

In der vorliegenden Untersuchung sollen die Verhältnisse bei der passiven Übertragung der verzögerten Reaktionsbereitschaft gegenüber der Vakzine-Virus-Infektion und nach Vakzine-Antigen-Kontakt durch Zellen untersucht werden.

Schon JENNER (1798) beobachtete, daß die Reaktion bei der Zweitimpfung mit Vakzine-Virus sich von der ersten deutlich im zeitlichen Ablauf unterscheidet. VON PIRQUET veröffentlichte 1907 seine Beobachtungen bei Erst- und Zweitimpfungen bei einer großen Anzahl von Kindern und Erwachsenen. Er hatte beobachtet, daß anders als bei der Erstimpfung die spezifische Impfreaktion (Area, Papel) bei der Wiederimpfung früher eintritt und einen anderen Verlauf aufweist (s. u.).

Besonders für eine langandauernde spezifische Abwehr von Erregern spielt die gewebliche Allergie oder Immunität eine große Rolle. Einige Zeit nach der Vakzine-Infektion fallen die humoralen Antikörper im Blut ab, um Jahre danach unter die Nachweisbarkeitsgrenze abzusinken. Bei erneuter Impfung kommt es dann aber nicht allein zu einer stürmischen Neubildung von humoralen Antikörpern, sondern auch die Lokalreaktion ist in Charakter und Ablauf wesentlich verändert: sie bildet sich rascher aus, die Area ist nicht so stark ausgeprägt und fast nie kommt es zu einer postvaccinalen Enzephalitis. Dieses "Immungedächtnis" kann nicht anders erklärt werden, als daß die Antikörper-bildenden Zellen sowie das Gewebe von der Erstimpfung her noch ein Engramm

besitzen, das sie zu dieser "anamnestischen" Reaktion befähigt. Ist eine längere Frist - einige Jahrzehnte - von der Erst- bis zur Wiederimpfung verstrichen, dann kann die Impfreaktion in Form und Verhalten vollkommen der einer Erstimpfreaktion gleichen; dennoch tritt bei diesen Impflingen selten eine Enzephalitis postvaccinalis auf, die eigentlich bei erwachsenen Erstimpflingen mit größerer Häufigkeit vorkommen müßte. HERRLICH (1965) nannte dieses schwer zu definierende andere Verhalten des Organismus gegenüber der Vakzine-Impfung eine "zentrale" Immunität. Sie spielt bei der Verhütung der Enzephalitis postvaccinalis bei Wiederimpflingen wahrscheinlich die entscheidende Rolle. Soweit bisher bekannt, steht auch sie mit der sogenannten "Gewebeimmunität" in engem Zusammenhang. Wenn diese "zentrale" Immunität nur an die Elemente des zentralen Nervensystems gebunden ist, wäre zu erwägen, ob sie auf die fehlende ständige Erneuerung und Zellmauserung dieser Gewebe zurückzuführen ist.

Schon VON PIRQUET (1907) nahm für die verzögerte Reaktion eine an Gewebe gebundene Immunität, d. h. sessile Antikörper an, eine Vorstellung, die in neuester Zeit durch Versuche bei der Tuberkulose durch GILLISSEN (1964) gestützt wurde. In seinen Untersuchungen konnte GILLISSEN nachweisen, daß bei der Reaktion von Zellen tuberculinpositiver Individuen mit Tuberculin Komplement (C'_3) gebunden wird, es sich also um eine echte Antigen-Antikörperreaktion handelt. Andererseits ist zu berücksichtigen, daß die Tuberculinreaktion nicht in allen Punkten der Infektion mit Vakzine-Virus entspricht. Bei der durch die Tuberkuloseinfektion bedingten Tuberculinallergie finden sich sehr günstige Versuchsbedingungen, da mit der Tuberculinreaktion keine durch

humorale Antikörper hervorgerufene Sofortreaktion interferiert. (O. STICKL und W. KNAPP, 1959). Bei manchen anderen Infektionen, wie auch der mit Vakzine-Virus, können humorale Antikörper die Gewebereaktion vom verzögerten Typ hemmen, wahrscheinlich durch vorzeitige Bindung und Inaktivierung des Antigens (GÜNTHER, 1964). Die einzige Beobachtung einer direkten Übertragung von sensibilisierten Zellen Vakzine-immunisierter Spender machte KEMPE 1960: bei einem 1-jährigen Jungen entwickelte sich nach der Pockenschutzimpfung eine große nicht heilende Wunde am Arm. Obwohl der Junge einen normalen Gammaglobulinspiegel hatte und nach Tetanus- und Diphterieimpfungen Antikörper gebildet hatte, konnten keine Antikörper gegen Vakzine-Virus festgestellt werden. Der Junge zeigte auch keine Hautreaktion bei subcutaner Injektion von hitzegetötetem Vakzine-Virus und reagierte nicht auf eine Injektion von 200 ml vaccinalem Hyperimmun-Gammaglobulin, die einen Neutralisationstiter von 1:64 hervorrief. Schließlich wurde der Arm amputiert. Aber an den Rändern der Amputationswunde entstanden immer neue Hautdefekte. Erst als sensibilisierte Leukozyten von einem mit Vakzine-Virus geimpften Spender rings um die Wunde gespritzt wurden, und gleichzeitig drei Lymphknoten in den Musculus rectus transversus und eine trypinisierte Zellsuspension von drei Lymphknoten von vaccinierten Spendern intravenös injiziert worden waren, trat eine Regression der vaccinalen Läsionen ein. Bei einem später durchgeführten subcutanen Hauttest zeigte es sich, daß nur die Haut mit einer verzögerten Reaktion reagierte, in welche vorher die Leukozyten injiziert worden waren. Durch die intravenöse Zellübertragung scheint also keine genera-

lisierte Hautsensibilisierung möglich zu sein.

Bei der vorliegenden Untersuchung einer Gewebeallergie gegenüber aktivem Vakzine-Virus und dem Vakzine-Antigen, einem formalinabgetöteten Vakzine-Virus, war es von großer Wichtigkeit den Einfluß von humoralen Antikörpern auszuschließen. Es wurden daher isolierte gewaschene weiße Blutzellen von immunisierten Kaninchen auf unbehandelte Tiere übertragen (intravenös oder intracutan injiziert). Die Prüfung der lokalen Reaktionsfähigkeit des Gewebes erfolgte durch Impfung mit Vakzine-Virus und durch Injektion von Vakzine-Antigen. Zum Ausschluß einer Sofortreaktion wurde gleichzeitig ein Farbtest mit Trypanblau (MENKIN, 1936) durchgeführt. Bei diesem Test kommt es bei der Sofortreaktion durch deren exudativ-serösen Charakter (RÖSSLE, 1933) zu einer Blaufärbung des umgebenden Gewebes (nach i. v. Gabe des Farbstoffes); hingegen tritt bei der mehr proliferativen verzögerten Reaktion keine Farbe in das Gewebe über (Untersuchungen bei Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen s. STICKL, MUNZ und VANEK 1964). Zum anderen wurden zur Feststellung der Sensibilisierung der weißen Blutzellen Cytolyseversuche in vitro durchgeführt. Die verstärkte Lyse von Zellen tuberkulöser Tiere in vitro bei Zugabe von Tuberculin entdeckte FAVOUR 1947. Seither ist ihr Vorkommen bei der Tuberkulose immer wieder bestätigt worden (FREMONT-SMITH und FAVOUR, 1948; FAVOUR, FREMONT-SMITH und MILLER, 1949; FAVOUR, HARRISON und OSGOOD, 1950; WAKSMAN 1953; BASSERMANN, 1954; GILLISSEN, 1964; weitere Literatur siehe bei HEILMAN 1963). Inwieweit das Vorkommen einer Cytolyse auf denselben Strukturen wie die Gewebeallergie beruht, ist dabei aber noch vollkommen offen. Andererseits kann der Einfluß hu-

moraler Antikörper bei der Immuncytolyse weitgehend ausgeschlossen werden.

Weiter war es für den Mechanismus der Immunreaktion interessant zu wissen, ob Zellen von Vakzine-immunisierten Tieren mehr Vakzine-Virus binden können als Zellen von unbehandelten Tieren. GILLISSEN (1964) konnte bei Zellen tuberkulöser Tiere feststellen, daß sie fähig sind, verstärkt Tuberculin zu binden. Daher wurden im Fortgange unserer Untersuchungen unabhängig von den Übertragungsversuchen der Gewebeallergie Virusadsorptionsversuche durchgeführt.

Somit ergeben sich für die folgenden Versuche mehrere Fragestellungen:

1. Inwieweit ist die Gewebeimmunität gegenüber Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen mit isolierten weißen Blutzellen übertragbar?
2. Unterscheidet sich das aktive vom inaktiven Vakzine-Virus in Hinsicht der Ausbildung einer übertragbaren Gewebeimmunität?
3. Ist die lokale Prüfung der Gewebeallergie mit Vakzine-Antigen möglich?
4. Ist die Immuncytolyse ein Kriterium für die Sensibilisierung von Zellen und somit für die Fähigkeit, die gewebliche Allergie passiv zu übertragen (sog. "Transfer")?
5. Wird von sensibilisierten Zellen verstärkt Vakzine-Virus adsorbiert?

II. Material und Methoden

1. Tiere:

Es wurden weiße Deutsche Riesenkaninchen stets der gleichen Inzuchtrasse mit einem Gewicht zwischen 3 und 4 kg, mit einem Durchschnittsalter von 1 Jahr bei den folgenden Versuchen verwendet.

2. Vakzine-Virus:

Das für die experimentellen Infektionen verwendete Virus ist dasselbe wie es für die normale Pockenschutzimpfung in der Bayerischen Landesimpfanstalt zu Anwendung kommt. Es handelt sich um ein vermehrungsfähiges Vakzine-Virus mit einem Virusgehalt von ca. 10^8 pfU/ml. Die Stabilisierung erfolgte durch Glycerin (ca. 50%). Die Infektiositätsprüfung des Virus wurde nach der Methode von HERZBERG (1955) durch kutane Titration am Kaninchen und durch Pockenherdzählung auf der Eihaut, wie sie von MAYR und MUNZ (1965) beschrieben wurde, durchgeführt.

Daneben wurde für die Versuche in vitro noch eine Vakzine-Virusaufbereitung verwendet, bei der das Vakzine-Virus auf Gewebekulturen von embryonalen Rindermuskelzellkulturen gezüchtet und gewonnen wurde.

3. Vakzine-Antigen:

Bei dem Vakzine-Antigen nach HERRLICH (1959) handelt es sich um eine durch 0,03% Formalin bei 4° C über 12 Tage inaktivierte Virussuspension von einem aus Gewebekulturen (s. o.) gewonnenen Vakzine-

Virus (s. a. MAHNEL 1960). Es stellt einen Totimpfstoff dar, der keine vermehrungsfähigen Viren enthält, aber seine antigenen Eigenschaften nicht vollkommen verloren hat (HERRLICH 1965). Da es noch keine befriedigende antigene Wertbestimmung des Vakzine-Antigens gibt (STICKL, MUNZ und VANEK 1964), wurde die Virussuspension vor Inaktivierung mit Formalin auf einen Virusgehalt von ca. 10^8 pfU/ml eingestellt. Auf die Problematik dieser mit einer gewissen Inkonstanz behafteten antigenen Werteinstellung wurde an anderer Stelle hingewiesen (MAYR u. MUNZ 1965); in den folgenden Versuchen kam daher stets die gleiche Charge des Vakzine-Antigens zur Anwendung.

4. Impfungen:

Die Impfungen der als Blutspender verwendeten Kaninchen mit Vakzine-Antigen erfolgte 4 mal im Abstand von 14 Tagen mit jeweils 0,75 ml Antigen in die Glutealmuskulatur. Sie wurden reizlos überstanden. Bei mehrmaliger Verwendung der Kaninchen als Blutspender wurde vor jeder weiteren Abnahme mindestens 5 Tage vorher mit 1 ml Vakzine-Antigen nachgeimpft.

Die Impfung mit Vakzine-Virus erfolgte auf die enthaarte Rückenhaut. Dazu wurden 4 ca. 2 x 2 cm große Hautareale nach HERZBERG (1955) scarifiziert, in die das Vakzine-Virus eingerieben wurde. Die Blutentnahmen fanden frühestens 3 Wochen nach der Impfung statt.

5. Leukozytengewinnung:

a. Die Leukozytengewinnung erfolgte nach NOWELL (1960):

Das aus der Ohrvene entnommene und heparinisierte Blut (5000 E Heparin[1] auf 20 ml Blut) wurde nach Zugabe von Phythämagglutinin "M"[2] (0,5 ml/20 ml Blut) 45 Minuten im Kühlschrank bei 4° C (Nowell verwendete Eiswasser) stehen gelassen. Ohne vorheriges Umschütteln erfolgte dann eine Zentrifugation für 5 min bei 350 Upm. Der Überstand, in dem sich die Leukozyten befanden, wurde mit einer Kapillare abgehoben und 10 min bei 1500 Upm zentrifugiert. Die sedimentierten Leukozyten wurden nach Resuspension in der 20 fachen Menge physiologischer Kochsalzlösung 3 mal gewaschen und anschließend jeweils bei 1500 Upm zentrifugiert. Die erhaltenen Leukozyten konnten dann auf die gewünschte Konzentration mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden.

b. Für die Versuche zur generalisierten Übertragung der Reaktion vom verzögerten Typ erfolgte die Leukozytengewinnung mit Hilfe eines Gelatine-Gels:
Dabei wurden 1 Teil Citratblut (0,8 Teile Citrat auf 1,2 Teile Blut) mit 2 Teilen verflüssigter 1%iger Gelatine gemischt und mit 3%iger Kochsalzlösung unterschichtet. Nach halbstündigem Stehen im Kühlschrank wurde das Gemisch 5 Minuten bei 350 Upm zentrifugiert und der Überstand einschließlich der Grenzschichte zwischen Gelatine und Kochsalzlösung, in der sich die Leukozyten befanden, abge-

---

1) Trombophob ad. inj. von Nordmark, oder Liquemin der Deutschen Hoffmann-La Roche A.G.

2) Phythämagglutinin "M" Code 0528 der Difco Laboratories.

hoben. Der Überstand wurde anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und erneut bei 1500 Upm zentrifugiert. Die dabei sich absetzenden Leukozyten wurden dann mit physiologischer Kochsalzlösung auf die benötigte Konzentration verdünnt.

III. Beschreibung der Versuche [1)]

A. Versuche zur generalisierten Übertragung der Reaktion vom verzögerten Typ durch intravenöse und intraperitoneale Injektion von Leukozyten und von Milzhomogenaten Vakzine-immuner Kaninchen.

Von zwei gegen Vakzine-Virus hochimmunen Kaninchen (4 Wochen zuvor massive Impfung mit Vakzine-Virus durch Hautscarification nach HERZBERG, 1955) wurden 60 ml Blut und die Milz entnommen. Die Milz wurde mit dem Ten Broeck'schen Glasmörser homogenisiert und durch zweimaliges Waschen in physiologischer Kochsalzlösung von Serum und Hämolysaten gereinigt. Die Milzsuspensionen beider Tiere wurden einem bisher ungeimpften Kaninchen intraperitoneal injiziert. Dieses an der Bauchhaut epilierte Kaninchen erhielt sodann eine Schnittimpfung (4 Impfschnitte von 1 cm Länge) mit Vakzine-Virus und eine mit physiologischer Kochsalzlösung als Leerkontrolle und außerdem zwei intracutane Injektionen von je 0,1 und 0,2 ml Vakzine-Antigen. Die gewaschenen mit Hilfe einer Gelatinelösung aus dem Blut gewonnenen Leukozyten der beiden gegen Vakzine-Virus hyperimmunen Kaninchen wurden einem weiteren unbehandelten Kaninchen in einer Menge von 60 Mill. (über 80% Lymphozyten) pro Tier i. v. injiziert. Bei diesem Tier wurden an der epilierten Bauchhaut ebenfalls vier Hautstellen wie bei dem vorigen Versuch behandelt, d. h. je eine mit Vakzine-Virus und physio-

---

1) Mit Sachbeihilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Priv. Doz. Dr. Stickl)

logischer Kochsalzlösung und zwei mit Vakzine-Antigen.

Ergebnisse

Im Vergleich zu einem nichtgeimpften oder anderweitig vorbehandelten Kontrolltier des gleichen Wurfes war keine Abweichung des Impfverlaufes bei den mit Milzsuspension und dem mit i. v. Leukozyteninjektion vorbehandelten Tieren zu erkennen: die Schnittimpfung mit Vakzine-Virus zeigte bei allen drei Tieren - Kontrolltier und den beiden Versuchskaninchen - eine normale Erstimpfreaktion (2 Tage leichte Rötung der Impfschnitte, am 4. Tag Ausbildung der Area mit Rötung, am 5. Tag Papelstadium, am 6. - 7. Tag Ausbildung von Bläschen und Pusteln, die in den zwei folgenden Tagen eintrocknen, dabei Schorfbildung, der erst nach ca. 2 Wochen abfällt). Die Leerkontrollen (Schnittimpfung mit physiologischer Kochsalzlösung) zeigte anfangs ebenfalls eine leichte traumatisch bedingte und rasch abklingende Rötung der Impfstellen. Die beiden Injektionsstellen mit Vakzine-Antigen zeigten dagegen überhaupt keine örtliche Reaktion. Weder mit intraperitoneal gespritzten Milzhomogenaten noch mit intravenöser Injektion von Leukozyten (überwiegend Lymphozyten) von immunen Kaninchen ließ sich demnach eine generalisierte Reaktionsbereitschaft vom verzögerten Typ übertragen.

B. Die lokale Übertragbarkeit der geweblichen Vakzineimmunität

1. Die Immuncytolyse als Kriterium für die "gewebliche Immunität" von isolierten Blutzellen

Eine Lyse von Zellen tuberkulöser Tiere, die in vitro über längere Zeit mit hohen Tuberculinkonzentrationen in Kontakt kamen, wurde 1947 erstmalig von FAVOUR beschrieben und im weiteren durch andere Autoren bestätigt (MILLER 1947, FREMONT-SMITH und FAVOUR 1948, FAVOUR, HARRISON und OSGOOD 1950, GILLISSEN 1964). Einen cytopathogenen Effekt mit teilweiser Lyse von Leukozyten nach Reaktion mit Vakzine-Virus in hoher Konzentration konnten NISHMI und BERNKOPF (1958) an Zellen von Tieren beobachten, die nicht gegen Vakzine-Virus immunisiert worden waren. Es handelte sich also nicht um eine Immuncytolyse (siehe ferner S. 46 Diskussion). Die folgenden Versuche dienten der Frage, ob eine spezielle Cytolyse bei der Vakzine-Immunität vorliegt, die dann als Nachweis für die Sensibilisierung der in den vorliegenden Untersuchungen verwendeten Zellsuspensionen gegen Vakzine-Virus, bzw. Vakzine-Antigen verwendet werden soll. Diese Versuche sind also geeignet, festzustellen, ob die Vorbedingungen eines "Transfers" mit isolierten Zellen (s. die folgenden Versuche) überhaupt vorliegen. Als Versuchstiere dienten jeweils Inzuchtstämme von Deutschen Albino-Riesenkaninchen und Meerschweinchen. Die Leukozyten der Kaninchen wurden als gewaschene konzentrierte Suspensionen verwendet (Gewinnung s. o., S. 10), während die Histiozyten und Leukozyten der Meerschweinchen aus Ascites einer sterilen Reizperitonitis gewonnen wurden und keine weitere Behandlung erfuhren (Abnahme des

Ascites 24 Stunden nach Setzen des peritonealen Reizes). Die Impfung mit Vakzine-Virus hatte 4 - 5 Tage vor der Gewinnung des Ascites stattgefunden (i. c. Injektion von 0,3 ml normaler Impflymphe in die Bauchhaut). Ein Meerschweinchen blieb als Kontrolle jeweils ungeimpft. In einigen Versuchen kamen auch Leukozyten vom Menschen mit vorangegangener Pockenschutzimpfung zur Anwendung. Als Ergebnis sei vorweggenommen, daß sich das Verhalten menschlicher und tierischer Leukozyten im Hinblick auf die Immuncytolyse mit Vakzine-Virus prinzipiell nicht unterschied (auf die Empfindlichkeit von Leukozyten verschiedener Herkunft wird weiter unten hingewiesen).

Versuchsanordnung :

Um eine mikroskopische Beobachtung und die Verhinderung der Austrocknung der zu untersuchenden Zellsuspensionen zu erreichen, wurde auf Objektträger ein Glasring von 12 mm lichtem Durchmesser und 4 mm Höhe angenietet. Der Verschluß erfolgte durch dünne Deckgläschen, die mit Hilfe von steriler Vaseline luftdicht auf den Glasring aufgesetzt wurden. In die so entstandene Kammer wurden jeweils 0,1 cm^3 konzentrierte Leukozytensuspension, 0,1 cm^3 TCM 199[1] als Nährmedium und 0,1 cm^3 einer Gewebekultursuspension von Vakzine-Virus (10^8 pfU/1 ml) oder Vakzine-Antigen gegeben. Die Kontrollen bestanden aus den jeweils verwendeten Leukozyten und TCM. Das bedeutet, daß von jeder Leukozytenart (Leukozyten von vaccinierten, mit Vakzine-Antigen geimpften oder

---

1) TCM 199 (tissue culture medium), pH 7,2, Gewebekulturmedium, hergestellt von den Behringwerken.

von unbehandelten Tieren) 3 Objektträger beschickt wurden : 1. Leukozyten mit TCM und Vakzine-Virus, 2. Leukozyten mit TCM und Vakzine-Antigen, 3. Leukozyten mit TCM als Kontrolle. Da auch für mehrere Versuche Dermolymphe verwendet wurde und zur Konservierung dieser Vakzine-Virus-Impflymphe Glycerin dient, wurden zusätzliche Kontrollen mit Zugabe der entsprechenden Glycerinkonzentrationen (33% und 50%) ausgeführt. Da aber keine Beeinflussung der Zellreaktionen festgestellt werden konnte, werden diese Kontrollen hier nicht weiter besprochen. Alle Versuchsansätze reagierten bei 37° im Brutschrank.

Zwei für die Veränderungen charakteristische Zeitpunkte ergaben sich aus den Versuchen mit "sensibilisierten" Leukozyten von Tier und Mensch; sie wurden für die Versuche mit normalen Leukozyten (Kontrollen mit Zellen ungeimpfter Tiere) zum Vergleich übernommen. Die erste mikroskopische Auswertung der Human- und Kaninchenzellversuche erfolgte nach 2 Stunden, die der Meerschweinchenzellversuche nach 16 Stunden. Dabei wurde das Verhältnis der veränderten zu den noch intakten Zellen im Blickfeld bestimmt. Die zweite Ablesung wurde zum Zeitpunkt der völligen Zellzerstörung bei den Humanleukozyten nach 4 bis 24 Stunden, bei den Kaninchenzellen nach 4 Stunden und bei den Meerschweinchenzellen nach 40 Stunden vorgenommen.

Ergebnisse

1. Versuche mit Kaninchenleukozyten.

Nach zwei Stunden konnte man eine deutliche Unterscheidung der Wirkung von Vakzine-Virus auf sensibilisierte und nichtsensibilisierte Leukozyten

beobachten. Die Leukozyten mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen geimpfter Tiere waren bis auf einige wenige Zellen verändert oder zerstört, während diejenigen der unbehandelten Kaninchen sich zu 2/3 vollkommen intakt zeigten und der Rest zu Stechapfelformen umgebildet war. Eine von den Kontrollen (nicht sensibilisierte Leukozyten) unterschiedene Wirkung des Vakzine-Antigens auf die sensibilisierten Leukozyten konnte nicht festgestellt werden; dabei war eine mäßige cytopathogene Wirkung wohl vorhanden, denn die Hälfte der Zellen waren stechapfelförmig geschrumpft wohingegen die Kontrollen nur 5 bis 20% veränderte Zellen aufwiesen. Osmotische Wirkungen konnten dadurch ausgeschaltet werden, daß bei den jeweiligen Versuchsgruppen immer dieselben TCM- und Vakzine-Antigen-Chargen verwendet wurden. Nach 4 Stunden zeigte sich das Bild noch differentierter. Die Leukozyten der mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen geimpften Kaninchen waren durch Vakzine-Virus vollkommen zerstört im Gegensatz zu den Leukozyten von ungeimpften Tieren, die zu 75% intakt waren. Bei den Kontrollen und den Zellen, denen Vakzine-Antigen zugesetzt worden war, kam es nach der ersten Ablesung zu keiner Veränderung mehr.
Es kann also zusammenfassend gesagt werden, daß bei Zellen (Leukozyten), welche von Kaninchen stammen, die mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen geimpft worden waren, eine Immuncytolyse bei Zusatz von Vakzine-Virus erfolgt. Eine Lyse gegenüber Vakzine-Antigen ließ sich nicht nachweisen.

2. Versuche mit Meerschweinchenleukozyten.

Diese Versuche wurden mit Zellen von vier Tage vor der Leukozyten-

abnahme mit Vakzine-Virus geimpften Meerschweinchen und ungeimpften Kontrolltieren durchgeführt. Bei der Ablesung nach 2 Stunden ergaben sich keine unterschiedlichen Veränderungen der Zellen der behandelten und der Kontrolltiere. Alle Zellen waren intakt und zeigten auch keine Stechapfelformen. Nach 16 Stunden konnte man bei den Zellen der geimpften Tiere, denen Vakzine-Virus zugesetzt worden war, eine Veränderung der Zellen beobachten. Die Struktur lockerte sich auf, die ganzen Zellen wurden größer und blasiger, bis sie sich ganz auflösten. Teilweise konnte man halbe große Zellen sehen. Die Leukozyten der ungeimpften Tiere zeigten keine Veränderungen. Die Einwirkung von Vakzine-Antigen führte bei den Zellen aller Tiere nicht zu sichtbaren Umbildungen. Eine vollständige Zerstörung der sensibilisierten Zellen trat erst nach 40 Stunden ein, während die Zellen der unbehandelten Kontrolltiere zum größten Teil noch intakt waren.

3. Versuche mit Humanleukozyten.

Die Versuche mit Humanleukozyten wurden, wie schon anfangs erwähnt, zur Ergänzung der Tierversuche durchgeführt, obgleich mit humanen sensibilisierten Leukozyten keine Transferversuche - dem Thema der Arbeit - durchgeführt wurden. Das Verhalten der Humanleukozyten entsprach prinzipiell dem der tierischen, wie die folgenden Versuche zeigen. In Ermangelung von geeigneten Versuchspersonen konnten diese Versuche nur mit Leukozyten geimpfter Menschen gemacht werden.

Bei einer Patientin kam nach Vorimpfung mit Vakzine-Antigen keine Impfreaktion nach Impfung mit Vakzine-Virus zustande. Bei den Cytolyseversuchen zeigte sich nun, daß durch die Einwirkung von Vakzine-Virus

und Vakzine-Antigen auf die Leukozyten nach 16 Stunden keinerlei Veränderungen der Zellen eingetreten waren : alle Zellen waren vollkommen intakt. Im Zusammenhang mit dem negativen Impfergebnis muß folglich angenommen werden, daß die Patientin keine Gewebsallergie gegen Vakzine-Virus ausgebildet hatte.

Bei den Leukozyten einer vor 7 Tagen mit Erfolg gegen Pocken geimpften 27jährigen Person (3. Impfung; 1. Impfung mit 1 Jahr, 2. Impfung mit 10 Jahren) waren alle Leukozyten nach 4 Stunden durch Vakzine-Antigen stechapfelförmig verändert und verklumpt und durch Vakzine-Virus vollkommen zerstört.

Eine 14 Monate zurückliegende Impfung lag bei Versuchsperson S vor. Bei der zweiten Ablesung, die erst nach 24 Stunden stattfand, zeigten sich bei den Zellen auf die Vakzine-Antigen eingewirkt hatte, keine Stechapfelformen mehr, wie bei der Beobachtung nach 2 Stunden. Einige wenige Zellen hatten sich in verschieden große blasige Strukturen umgewandelt, die sich auflösten, wenn sie etwa die doppelte Leukozytengröße erreicht hatten. Diese Art der Leukozytenauflösung konnte sonst nur bei der Einwirkung von Vakzine-Virus auf Meerschweinchenleukozyten von vaccinierten Tieren beobachtet werden. Nach 24 stündiger Reaktionsdauer des Vakzine-Virus mit den Leukozyten zeigten sich bei dieser Versuchsperson noch intakte Zellen, obwohl der größte Teil zerstört war.

Die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Einwirkung von Vakzine-Virus auf die Leukozyten bei den letzten drei beschriebenen Versuchspersonen lassen darauf schließen, daß eine verschieden starke Empfindlichkeit der Zellen vorliegt. Diese ist offensichtlich um so größer, je kürzer der

Zeitraum nach der letzten positiven Impfung mit Vakzine-Virus war.

Aus den Versuchen geht ferner hervor, welcher Zeitpunkt der günstigste nach der Pockenimpfung der Versuchstiere ist, um mit größter Sicherheit optimal sensibilisierte und für einen "Transfer" der Gewebeallergie geeignete Zellen zu gewinnen. Die Blutentnahmen erfolgten bei den Spendertieren (Kaninchen) daher 20 Tage bis 6 Wochen nach der Pockenimpfung.

2. Versuche zur Übertragung der verzögerten Reaktion durch s. c. Injektion von Leukozyten mit Vakzine-Virus oder mit Vakzine-Antigen immunisierter Kaninchen in die Haut ungeimpfter Versuchstiere.

Die oben beschriebenen Vorversuche (unter III. A.) ließen annehmen, daß es nicht gelingt eine generalisierte Reaktionsbereitschaft vom verzögerten Typ (R. v. T.) bei der Vakzine-Immunität durch Leukozyten und Milzgewebe auf ein Empfängertier zu übertragen. Im Gegensatz hierzu konnte LAWRENCE (1955) nach lokaler (i. c.) Injektion von Leukozyten tuberculosekranker Menschen auf Gesunde eine generalisierte Tuberculinsensibilisierung beobachten. Die in den vorliegenden Versuchen zur Injektion gekommenen Mengen an Zellen waren ausreichend groß, legt man die Verhältnisse bei der Tuberculinallergie zugrunde. Versuche von KEMPE (1960) bestätigten dies, wonach eine generalisierte Sensibilisierung gegenüber Vakzine-Virus durch i. v. Einspritzung trypinisierter Zellsuspensionen von drei Lymphknoten von Menschen, die erfolgreich mit Vakzine-Virus geimpft worden waren, ebenfalls nicht gelang. Eine

lokale Vakzine-Sensibilisierung der Haut erzielte Kempe dagegen in naher Umgebung von intracutanen Injektionsstellen mit "sensibilisierten" Leukozyten. In allen weiteren hier vorliegenden Versuchen wurden daher Leukozyten von Vakzine-immunen Tieren auf ihre Fähigkeit eine spezifische Reaktionsbereitschaft der Gewebe vom verzögerten Typ zu übertragen nur am Ort ihrer Injektion in die Haut geprüft.

Wie bereits beschrieben (s. Material und Methoden), wurden die isolierten "sensibilisierten" Leukozyten von Tieren, die entweder mit Vakzine-Virus (Lebendimpfstoff) oder mit Vakzine-Antigen (Totimpfstoff) immunisiert worden waren, unbehandelten Inzuchtkaninchen der gleichen Rasse in die epilierte Bauchhaut injiziert. Um eine immunologische Transplantationsreaktion ("homograft-reaction") weitgehend auszuschließen, wurden für alle Versuche Inzuchtkaninchen möglichst des gleichen Wurfes verwendet. Die Übertragung einer spezifischen Gewebereaktion konnte nun durch Impfung mit lebendem Virus geprüft werden, indem dieses in die Haut über dem Leukozyteninfiltrat mit Hilfe von Impfschnitten eingerieben wurde, bzw. erfolgte die Prüfung durch Injektion von Vakzine-Antigen, welches intracutan über das Zellinfiltrat injiziert wurde. Als Kontrollen dienten jeweils Leukozyteneinspritzungen und Impfschnitte mit Vakzine-Virus allein, bzw. intracutane Injektionen von Vakzine-Antigen in andere Hautstellen. Da die verwendeten Leukozyten - wie bereits erwähnt - von Kaninchen stammten, die entweder mit einer Vakzine-Virus-Infektion oder durch Injektionen von Vakzine-Antigen immunisiert wurden, und die Prüfung ihrer Reaktionsbereitschaft einmal durch Vakzine-Virus zum anderen mit Vakzine-Antigen durchgeführt werden konnte, ergaben sich bei den Versuchen vier Kombinationsmög-

lichkeiten :

1. Injektion von Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Virus immunisiert waren. Prüfung der verzögerten Reaktion mit Vakzine-Virus (Tab. I).

2. Injektion von Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Virus geimpft waren. Prüfung ihrer Reaktionsbereitschaft mit Vakzine-Antigen (Tab. II).

3. Injektion von Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Antigen sensibilisiert waren. Prüfung ihrer allergischen Reaktion mit Vakzine-Virus (Tab. III).

4. Injektion von Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Antigen geimpft waren. Prüfung ihrer Reaktionsbereitschaft durch Vakzine-Antigen (Tab. IV).

Außerdem wurden noch Kontrollversuche durchgeführt, bei denen Leukozyten von unbehandelten Kaninchen in der beschriebenen Weise auf eine mögliche Reaktion mit Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen geprüft wurden.

Eine verzögerte Reaktion ist dadurch charakterisiert, daß eine spezifische Entzündungsreaktion mit Induration auftritt : sie beginnt etwa 4 - 8 Stunden nach der Injektion und erreicht ihren Höhepunkt erst 10 - 18 Stunden nach der Injektion : die Anwesenheit von humoralen Antikörpern ist dabei nach GELL und BENACERRAF (1961) ausgeschlossen oder doch von untergeordneter Bedeutung. Dies bedeutet für die hier durchgeführten Versuche, daß an der Reaktion des Gewebes mit Vakzine-Virus, bzw. mit dem Vakzine-Antigen abgelesen werden kann, ob durch die injizierten allergisierten Leukozyten die spezifische Gewebeallergie vom verzögerten Typ über-

tragen wurde. Durch die Kontrollimpfung mit Vakzine-Virus, bzw. Vakzine-Antigen an nicht mit Leukozyten behandelten Hautstellen und an solchen Stellen, die mit nicht sensibilisierten Leukozyten behandelt wurden, kann zudem eine Unterscheidung der normalen Impfreaktion von der durch allergische Prozesse modifizierten vorgenommen werden; im letzteren Falle kommt es zu einem beschleunigten lokalen Reaktionsablauf, wenn die injizierten Leukozyten sensibilisiert waren.

Versuchsbeschreibung :

Von den mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen immunisierten Kaninchen wurden aus der Ohrvene je Tier 40 ccm Blut steril entnommen. Nach Isolierung und Waschung der Leukozyten (s. Material und Methoden) erfolgte die Auszählung in der Bürker'schen Kammer und die Differenzierung mit Hilfe eines nach May-Grünwald-Giemsa gefärbten Blutbildes. Die konzentrierte Leukozytensuspension wurde einem unbehandelten Kaninchen an zwei Stellen in die epilierte Bauchhaut an der rechten Seite im Abstand von 10 cm in einer Menge von 0,4 oder 0,6 ml s. c. injiziert (genaue Leukozytenzahlen pro Hautstelle s. Tabellen). In die über dem Leukozyteninfiltrat nach der Methode nach HERZBERG (1955) scarifizierte Haut, wobei mit der Impflanzette kleine flache sich kreuzende Schnitte von 1 cm Länge gelegt werden, wurde die Vakzine-Virus-Suspension eingerieben (Stelle rechts cranial). Bei der Prüfung der Reaktionsbereitschaft der Leukozyten mit Vakzine-Antigen, erfolgte eine intracutane Injektion von 0,5 ml Vakzine-Antigen in dasselbe vordere Hautareal, in welches die zu prüfenden Leukozyten gespritzt waren. Ein weiteres Leukozyteninfiltrat (rechts caudal) diente als Kontrolle ohne weiter behandelt

zu werden. An der linken vorderen Bauchseite erfolgte eine vergleichende Impfung nach Hautscarifizierung mit Vakzine-Virus, bzw. eine intracutane Injektion von 0,5 ml Vakzine-Antigen - je nach Art der Prüfung - als zweite Kontrolle. Am 1. oder 2. Tag wurde den Kaninchen pro kg Körpergewicht 0,6 ml einer 1%igen gepufferten und körperwarmen Trypanblaulösung i. v. injiziert, um eine exudative Reaktion vom Sofort-typ auszuschließen. Die Ablesungen erfolgten in 30 minutigen Abständen bis 5 Stunden.

Tab. I. Reaktionsverlauf nach normaler Erstimpfung eines unbehandelten Kaninchens mit Vakzine-Virus und nach vorheriger s. c. Injektion von Leukozyten vaccinierter Kaninchen in die Haut der Impfstelle.

Zeichenerklärung: o Rötung
\+ leichte tastbare Schwellung
++ erbsengroße Induration
+++ zehnpfenniggroße feste Schwellung
ø keine Reaktion sicht- und tastbar

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	letzte positive Impfung mit VaK. Virus	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. Schnittimpfung mit VaK. Virus	Kontrolle: Schnittimpfung mit VaK. Virus	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
1	Kanin. Nr. 155	vor 29 Tagen	Seg. 30 % Ly. 60 % Mo. 2 % Eo. 8 % 2,24 Mill.	18 Stdn 2. Tag 3. " 8. "	ø ø ø ø	ø ø ø ø	+++ ++ + +
					Ergebnis: Keine Reaktion vom verzögerten Typ durch Leukozyten, negative Kontrollerstimpfung		
2	Kanin. Nr. 181	vor 28 Tagen	Seg. 36 % Ly. 57 % Mo. 2 % Eo 5 % 2,16 Mill.	18 Stdn. 2. Tag 3. " 5. " 7. "	++ ++ ++ + o	o o o o o	++ ø ø ø ø
					Ergebnis: positive Reaktion vom verzögerten Typ durch		Leukozyten
3	Kanin. Nr. 153	vor 41 Tagen	Seg. 53% Ly. 40 % Mo. 1 % Eo. 6 % 2,84 Mill.	17 Stdn. 2. Tag 3. " 5. " 6. "	o +++ +++ ++ ++	o + + o o	ø ø ø ø ø
					Ergebnis: positive Reaktion vom verzögerten Typ durch		Leukozyten

Tab. I. Fortsetzung

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	letzte positive Impfung mit Vak. Virus	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
4	Kanin. Nr. 155	vor 63 Tagen	Seg. 42 % Ly. 53 % Mo. 3 % Eo. 2 % 5,88 Mill.	17 Stdn. 2. Tag 3. " 6. " 7. " 8. " 9. "	o o o + + + + + + + + + +	o o o + + + + + + + + + +	+ o o o o o ø
					Ergebnis: Keine verzögerte Reaktion durch Leukozyten, Reaktion wie bei Erstimpfg.		
5	Kanin. Nr. 190	vor 21 Tagen	Seg. 45 % Ly. 51 % Mo. 1 % Eo. 3 % 0,24 Mill.	20 Stdn. 2. Tag 3. " 4. " 5. "	++ o ++ o ++ o ++ o +	+ o ++ o +++ o +++ o +	ø ø ø ø ø
					Ergebnis: positive Reaktion vom verzögerten Typ durch		Leukozyten

Tab. II. Reaktionsverlauf nach i. c. Injektion von Vakzine-Antigen in die Haut ungeimpfter Kaninchen und nach vorheriger s. c. Injektion von Leukozyten vaccinierter Kaninchen in die Haut der Impfstelle.

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	letzte positive Impfung mit Vak. Virus	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s. c. Leukozyteninfiltrat u. i. c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: i. c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
1	Kanin. Nr. 190	vor 21 Tagen	Seg. 45 % Ly. 51 % Mo. 1 % Eo. 3 % 0,24 Mill.	20 Stdn 2. Tag 3 " 4 " 5 " 7 "	++ o ++ o ++ ++ ++ o +	ø ø ø ø ø ø	ø ø ø ø ø ø
					Ergebnis: positive Reaktion vom verzögerten Typ durch Leukozyten		
2	Kanin Nr. 155	vor 29 Tagen	Seg. 30 % Ly. 60 % Mo. 2 % Eo. 8 % 2,24 Mill.	18 Stdn 2. Tag 3. " 6 "	ø o ø ø	ø ø ø ø	ø o ø ø
					Ergebnis: Keine Reaktion vom verzögerten Typ durch Leukozyten, Keine Erstimpfreaktion		

Tab. III. Reaktionsverlauf nach normaler Erstimpfung eines unbehandelten Kaninchens mit Vakzine-Virus und nach vorheriger s. c. Injektion von Leukozyten eines mit Vakzine-Antigen mehrmals geimpften Kaninchens.

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	letzte positive Impfung mit Vakzine Antigen	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
1	Kanin. Nr. 146 u. 147	vor 21 Tagen	Seg. 40 % Ly. 52 % Mo. 4 % Eo. 4 % 1,74 Mill.	17 Stdn. 2. Tag 3. " 6. " 7. " 8. "	0 0 Ø + + + + + +	0 0 0 + + + + + +	0 0 Ø 0 Ø Ø
					Ergebnis: Keine verzögerte Reaktion durch Leukozyten, Reaktion wie bei Erstimpfung		
2	Kanin. Nr. 147	vor 61 Tagen	Seg. 48 % Ly. 43 % Mo. 4 % Eo. 5 % 1,4 Mill.	20 Stdn. 2. Tag 3. " 4. " 6. "	+ + 0 + + 0 + + 0 + + 0 + + 0	+ 0 ++ 0 + ++ 0 + + + 0 + + + 0	
					Ergebnis: verzögerte Reaktion durch Leukozyten, beschleunigte Erstimpfreaktion		

Tab. IV. Reaktionsverlauf nach i. c. Injektion von Vakzine-Antigen in die Haut ungeimpfter Kaninchen und nach vorheriger s. c. Injektion von Leukozyten eines mit Vakzine-Antigen mehrmals geimpften Kaninchens.

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	letzte positive Impfung mit Vak. Antigen	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. i.c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: i.c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
1	Kanin. Nr. 147	vor 61 Tagen	Seg. 48 % Ly. 43 % Mo. 4 % Eo. 5 % 1,4 Mill.	20 Stdn. 2. Tag 3. " 4. " 6. "	+ + + + + + o + + + +	ø ø ø ø ø	
					Ergebnis: positive Reaktion vom verzögerten Typ durch Leukozyten		

Tab. V. Kontrolle : Reaktionsverlauf der normalen Erstimpfung eines unbehandelten Kaninchens mit Vakzine-Virus - Versuch 1 - und mit Vakzine-Antigen - Versuch 2 - und nach vorheriger s. c. Injektion von Leukozyten eines unbehandelten Kaninchens in die Haut der Impfstelle.

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	Impfung	differenziertes Blutbild u. Anzahl der injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Schnittimpfung mit Vak. Virus	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
1	Kanin.	keine Impfung	Seg. 47 % Ly. 44 % Mo. 3 % Eo. 6 % 0,42 Mill.	20 Stdn.	o	o	ø
				2. Tag	o	o	ø
				3. "	+ o	+ o	ø
				5. "	+++ o	+++ o	ø
				6. "	+++ o	+++ o	ø
				7. "	+ o	+ o	ø
					Ergebnis: Keine Reaktion vom verzögerten Typ durch nichtsensibilisierte Leukozyten		

Versuchs-Nr.	verwendete Blutspender	Impfung	differenziertes Blutbild u. Anzahl d. injizierten Leukozyten	Ablesung (Zeit nach der Injektion)	Injektionsstellen am unbehandelten Versuchskaninchen		
					s.c. Leukozyteninfiltrat u. i.c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: i.c. Vakzine Antigen Injektion	Kontrolle: Leukozyteninfiltrat
2	Kanin.	Keine Impfung	Seg. 47 % Ly. 44 % Mo. 3 % Eo. 6 % 0,42 Mill.	20 Stdn.	ø	ø	ø
				2. Tag	ø	ø	ø
				3. "	ø	ø	ø
				5. "	ø	ø	ø
				6. "	ø	ø	ø
				7. "	ø	ø	ø
					Ergebnis: Keine Reaktion vom verzögerten Typ durch nichtsensibilisierte Leukozyten		

Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsreihen wurden jeweils in Form einer Tabelle zusammengefaßt. Dabei bedeuten :

○ Rötung

\+ leichte tastbare Schwellung

\+\+ erbsengroße Induration

\+\+\+ zehnpfenniggroße feste Schwellung

⌀ keine Reaktion sicht- und tastbar

Auf die Angabe des Zeitpunktes der Verschorfung wurde verzichtet, da sie hier nicht als Maß verwendet werden konnte.

Bei der Mehrzahl der Versuche konnte das Auftreten einer allergischen Reaktion, die durch die Leukozyten bei ihrem Kontakt mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen hervorgerufen sein muß, innerhalb eines Zeitraumes von 17 bis 20 Stunden, in einem Fall (Versuch 3 Tab. I) am 2. Tag nachgewiesen werden. Diese Werte lagen für die Reaktion vom verzögerten Typ im Bereich der Norm (GELL u. BENACERRAF 1961, KABAT u. MAYER 1961). Bei der Prüfung inwieweit die transplantierten Leukozyten die Reaktion auf das Vakzine-Virus beeinflussen, bot sich außerdem noch der Vergleich mit der normalen Schnittimpfung vom Vakzine-Virus an; bei ihr setzt als Erstimpfung der Höhepunkt der Reaktionen erst später ein, beim Kaninchen durchschnittlich am 6. Tag. Dieser "Normalfall" trat bei den vorliegenden Versuchen nur dort auf, wo keine Reaktion vom verzögerten Typ durch die Leukozyten nachgewiesen werden konnte. Bei den Versuchen, die eine allergische Reaktion der Leukozyten

zeigten, kam es entweder zu einer beschleunigten Impfreaktion (Tab. I Versuch 5, Tab. III Versuche 1 und 2) oder aber diese erreichte überhaupt kein ausgesprochenes Maximum (Tab. I Versuche 2 und 3); in ihrem blanden Verlauf ähnelte sie eher einer Zweitinfektion.

Bei den Versuchen, wo die Übertragbarkeit einer zellgebundenen Allergie durch injizierte sensibilisierte Leukozyten mit Vakzine-Antigen als Testantigen geprüft wurde, fiel die Vergleichsmöglichkeit mit der normalen Impfreaktion ohne vorherige Zelltransplantation fort, da Vakzine-Antigen-Injektionen gewöhnlich keine lokal sichtbaren Hautveränderungen hervorrufen.

In den beiden Versuchsgruppen, bei denen Leukozyten von vaccinierten Kaninchen verwendet wurden (Tab. I und II), sind bei drei Versuchen keine Reaktionen vom verzögerten Typ aufgetreten, nämlich bei den Versuchen 1 und 4 in Tabelle I und Versuch 2 Tabelle II. Die Leukozyten stammten bei allen drei Versuchen von demselben Kaninchen (Nr. 155). Da die Kontrolle einer vorhandenen Sensibilisierung der Leukozyten durch Cytolyse erst später in das Versuchsprogramm aufgenommen wurde, fehlen von den Zellen dieses Kaninchens entsprechende Vergleichsmöglichkeiten. Die Zeit der Blutabnahme beim Spendertier, 29 Tage nach der Impfung mit Vakzine-Virus, hätte für eine Sensibilisierung ausreichen müssen. Als 63 Tage nach der Impfung der Versuch wiederholt wurde, zu welchem von demselben Spendertier (Versuch I/4) erneut ohne nochmalige Nachimpfung Blut abgenommen worden war, zeigte sich außerdem deutlich, daß keine Sensibilisierung der Leukozyten vorgelegen hatte. Dementsprechend bildete sich an den Impfstellen mit Vakzine-Virus sowohl mit als auch ohne Leukozyteninfiltration bei einem vorher nicht ge-

impften Versuchstier eine normale Erstimpfreaktion an beiden Impfstellen gleichzeitig aus; sie erreichte ihren Höhepunkt am 6. Tag. Bei dem Versuch I/1 bildete sich bei dem ungeimpften Versuchskaninchen auch bei der Kontrollschnittimpfung mit Vakzine-Virus keine Impfreaktion aus, was darauf schließen läßt, daß die hier verwendete Viruscharge inaktiv war. Bei den Versuchen mit Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Antigen mehrmals geimpft waren (Tab. III und IV), kam es in einem Fall, wo Leukozyten von zwei Kaninchen verwendet wurden, zu keiner Übertragung einer Gewebeallergie (Tab. III/1), obwohl die letzte Antigeninjektion der Spendertiere erst 21 Tage zurücklag und die Kaninchen in den drei Monaten vorher 8 mal mit Vakzine-Antigen geimpft worden waren. Trotz dieser intensiven Immunisierung entsprachen die auf die Impfung mit lebendem Vakzine-Virus folgenden Reaktionen in Form und zeitlichen Ablauf denjenigen einer Erstimpfung. In zwei späteren Versuchen (nach 61 Tagen, ohne nochmalige Nachimpfung) mit einem dieser beiden Spenderkaninchen (Kaninchen 147, Ver. 2 Tab. III, Versuch 1 Tab. IV) trat am Ort der Leukozytentransplantation und der Impfung mit aktivem Vakzine-Virus, bzw. Vakzine-Antigen eine Reaktion vom verzögerten Typ auf (Immunisierung des Spendertieres mit 4 x 0,75 ml und 4 x 1,0 ml Vakzine-Antigen). Bei den Immuncytolyseversuchen zeigten die Leukozyten dieses Kaninchens eine starke Lyse. Die Fähigkeit der Leukozyten eine Gewebeimmunität zu übertragen, war noch 61 Tage nach der letzten Vakzine-Antigen-Auffrischimpfung nachzuweisen. Eine Abhängigkeit der Versuchsergebnisse von der Zellzusammensetzung des Blutes (Differentialblutbild) konnte nicht festgestellt werden zumal bei allen Tieren die Lymphozyten überwogen (um 50%) und keine großen Abweichungen bei

der Differenzierung des Blutbildes sichtbar wurden.

Die Injektionen von Trypanblau führten bei keinem Kaninchen zu einer Ausbildung von Blauhöfen an den Leukozyten-Injektionsstellen nach einem oder zwei Tagen. Es war also nicht zu einer exsudativ serösen Entzündung, sondern zu einer der verzögerten Reaktion entsprechenden proliferativen Gewebeveränderung gekommen.

Bei den Kontrolluntersuchungen mit Leukozyten von unbehandelten Kaninchen (Tab. V) ergab sich nach der Transplantation der Zellen auf ungeimpfte Tiere an den Impfstellen mit Vakzine-Virus (Tab. V/1) sowohl mit als auch ohne Leukozyteninfiltration eine regelrechte Erstimpfreaktion, bei der Verwendung von Vakzine-Antigen (Tab. V/2) als Testsubstanz kam es zu keiner sichtbaren Reaktion. Diese Ergebnisse bei Leukozyten von nichtgeimpften Kaninchen zeigen, daß keine Sensibilisierung der Zellen vorgelegen hat. Die Cytolyse bestätigte diese Resultate. Bei den Leukozyten dieser unbehandelten Kaninchen trat keine Lyse bei der Reaktion mit Vakzine-Virus auf.

3. Virusadsorbtion an "sensibilisierte" Leukozyten.

Durch in vitro Versuche mit Leukozyten von tuberculösen Tieren hat GILLISSEN (1964) festgestellt, daß diese Zellen mehr Alttuberculin binden können als solche von normalen Tieren. GILLISSEN nimmt dabei Strukturen an der Zelloberfläche an, die Antikörpern ähnlich sind. Diese binden das Antigen und gehen mit ihm einen Antigen-Antikörper-Komplex ein, der fähig ist, Komplement zu fixieren. Davon offenbar unabhängig tritt außerdem ohne Komplementverbrauch die Bindung von gereinigten Tuberculinfraktionen auf.

In den vorliegenden Versuchen sollte untersucht werden, ob Leukozyten von Kaninchen, die mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen geimpft worden waren, verstärkt Vakzine-Virus binden können. Eine erhöhte Affinität sensibilisierter Leukozyten zu dem in unmittelbarer Nachbarschaft vom Orte der Transplantation inoculierten Virus ist für die Frage von Interesse, ob eine verstärkte örtliche Bindung des Virus an das Gewebe auftritt. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Leukozyten von geimpften Kaninchen wurden in Zentrifugengläsern mit Vakzine-Virus versetzt. Als Kontrolle dienten normale Leukozyten und physiologische Kochsalzlösung, denen ebenfalls Vakzine-Virus zugesetzt wurde. Nach einer halben Stunde Reaktionsdauer bei Zimmertemperatur wurden die Leukozyten abzentrifugiert und der eventuelle Verlust an Virus im Überstand mit Hilfe des Hämagglutinationstestes (MAYR 1956) bestimmt. Es ist dabei offenkundig, daß die Methode grob ist und folglich feinere Unterschiede in den Ergebnissen nicht aufzeigen kann.

Versuchsanordnung.

Versuch I

Es wurden vier Verdünnungsreihen mit je 10 Zentrifugengläsern hergestellt. In das 2. - 10. Röhrchen wurde jeweils 1 ml physiologische Kochsalzlösung, in das 1. Röhrchen 2 ml Vakzine-Virus in 1:4 verdünnter Lösung gegeben. Aus Röhrchen 1 wurde 1 ml Vakzine-Virus auf das Röhrchen 2 übertragen, aus diesem wiederum 1 ml in Röhrchen 3 u. s. w. In jedes Zentrifugenglas der ersten 3 Reihen wurden nun 0,1 ml der zu prüfenden Leukozytensuspensionen, die auf 2900 Zellen/mm^3 einander angeglichen worden waren, gegeben. Die vier Antigenverdünnungsreihen wur-

den also folgendermaßen beschickt:

1. Leukozyten von einem vaccinierten Kaninchen (Impfung 4 Wochen vorher).
2. mit Leukozyten von dem Kaninchen Nr. 147, das mehrmals (4 x 0,75 ml, 4 x 1,0 ml Vakzine-Antigen) mit Vakzine-Antigen geimpft worden war.
3. mit Leukozyten von einem unbehandelten Kaninchen.
4. mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung als Kontrolle.

Die so angesetzten Versuchsreihen blieben 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wurden bei 1500 Upm über 10 min die Leukozyten abzentrifugiert. Zu jeweils 1 ml des Überstandes wurden nun 0,05 ml einer 10%igen Hühnererythrozytensuspension gegeben (10%ig, wobei die konzentrierte gewaschene Erysuspension als 100% angenommen wird). Nach gutem Durchschütteln der Gemische blieben diese 60 min bei Zimmertemperatur stehen und wurden dann abgelesen. Bei der Auswertung wurde als positiv dasjenige Röhrchen angesehen, bei dem alle Blutkörperchen agglutiniert und abgesetzt waren. Bei Schräghalten des Glases kam es zu keinem Auslaufen von nichtagglutinierten Erythrozyten. Bei der Ablesung nach 60 Minuten zeigten sich positive Reaktionen bei folgenden Verdünnungen, die als Hämagglutinationstiter mit Vakzine-Virus bezeichnet werden :

1. Überstand von Leukozyten vom vaccinierten Kaninchen 1:128
2. Überstand von Leukozyten vom Kaninchen, das mit Vakzine-Antigen geimpft wurde 1:64
3. Überstand von Leukozyten vom unbehandelten Kaninchen 1:256
4. Kontrolle mit physiologischer Kochsalzlösung 1:256

Die Gemische wurden nochmals aufgeschüttelt und nach 24 Stunden Stehens

bei Zimmertemperatur abgelesen. Titerveränderungen waren nicht zu verzeichnen.

Versuch II

Es wurden Leukozytensuspensionen von einem 3 Wochen vorher vaccinierten und einem unbehandelten Kaninchen verwendet. Jeweils 1 ml der Leukozyten, die auf eine Anzahl von 7200/mm^3 angeglichen worden waren, wurde mit 1 ml Gewebekulturvirus (10^7 pfU/1 ml) versetzt und 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Leukozyten bei 1500 Upm über 10 min abzentrifugiert. Mit 1 ml des Überstandes wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese bestand aus 3 mal 12 Reagenzgläsern, in denen sich jeweils 1 ml physiologische Kochsalzlösung befanden. In das Glas 1 der 1. Reihe wurde nun 1 ml des Leukozytenüberstandes von dem vaccinierten Kaninchen, in das der 2. Reihe 1 ml des Überstandes von den Leukozyten des unbehandelten Kaninchens gegeben. In das 1. Glas der 3. Reihe wurde 1 ml Gewebekulturvirus zur Kontrolle eingefüllt. Die Verdünnung erfolgte nun so, daß jeweils aus dem ersten Glas 1 ml herauspipettiert und in das 2. Glas hineingegeben wurde, aus dem wiederum 1 ml entnommen und in das 3. Glas gegeben wurde u. s. w. Es entsteht somit eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2. Jedes Reagenzglas erhielt dann einen Zusatz von 1 ml einer 0,5%igen Hühnererythrozytensuspension. Die Ablesungen nach 60 min Stehens bei Zimmertemperatur und nach 24 Stunden ergaben folgende Hämagglutinationstiter mit Vakzine-Virus:

1. Leukozytenüberstand vom vaccinierten Kaninchen

nach 60 min 1:16, 1:32 nach 24 Stunden

2. Leukozytenüberstand vom ungeimpften Kaninchen

nach 60 min 1:32, 1:64 nach 24 Stunden

3. Vakzine-Virus Kontrolle

nach 60 min 1:64, 1:64 nach 24 Stunden.

Ergebnisse

Bei beiden Versuchen konnte festgestellt werden, daß die Leukozyten von Kaninchen, die entweder mit Vakzine-Virus oder mit Vakzine-Antigen geimpft worden waren, Vakzine-Virus adsorbiert haben, wohingegen die Zellen der ungeimpften Tiere überhaupt kein Virus gebunden haben. Ihre Titer entsprachen denen der Leerkontrollen mit Kochsalzlösung.

IV. Diskussion der Ergebnisse.

Bei den Versuchen einer Übertragung der Reaktionsbereitschaft vom verzögerten Typ mit Leukozyten Vakzine-immuner Kaninchen auf unbehandelte Tiere der gleichen Inzuchtrasse ergab sich, daß bei intraperitonealer oder intravenöser Gabe der sensibilisierten Zellen keine generalisierte Hautallergie hervorgerufen werden konnte, wie es im Gegensatz dazu CHASE (1945) und LAWRENCE (1949) bei der Tuberculinallergie gelang. Die Prüfung der verzögerten Reaktionsbereitschaft der Haut erfolgte bei den vorliegenden Versuchen mit aktivem Vakzine-Virus oder mit Vakzine-Antigen (formalininaktiviertes Vakzine-Virus). Dabei muß die Möglichkeit erwogen werden, daß zwar eine geringgradige Gewebeimmunität nach der Zellübertragung vorhanden war, diese aber durch die verhältnismäßig starke Infektionsdosis des als Prüfantigen dienenden aktiven Vakzine-Virus durchbrochen wurde, während andererseits das Vakzine-Antigen in seiner antigenen Fähigkeit soweit eingeschränkt ist, daß es im vorliegenden Fall möglicherweise als Testantigen weniger geeignet ist, obwohl es noch genügend antigene Wirkung hat um die Bildung humoraler Antikörper wie auch einer Gewebeimmunität hervorzurufen. Im Gegensatz hierzu ist mit Tuberculin keine aktive Immunisierung möglich, doch erwies es sich als sehr starke Prüfsubstanz, mit der die Übertragung einer generalisierten Hautempflindlichkeit nachgewiesen werden konnte. Diese Versuche und Beobachtungen zeigen, daß jede Infektionskrankheit ihr eigenes charakteristisches immunologisches Verhalten aufweist, und daß die Verhältnisse der einen nicht einfach auf alle übrigen im Sinne eines Modells übertragen werden können, d. h., daß die am

meisten studierten und als Prototyp einer Gewebeallergie angesehenen Verhältnisse der Tuberculinempfindlichkeit nicht einfach auf das Verhalten der vakzinalen (humoralen und geweblichen) Immunität bzw. Allergie übertragbar sind.

Wurden dagegen die Leukozyten von Vakzine-immunen Kaninchen unbehandelten Kaninchen intracutan in die Bauchhaut injiziert, so konnte sowohl durch Schnittimpfung mit Vakzine-Virus als auch durch subcutane Injektion von Vakzine-Antigen in den Ort des Leukozyteninfiltrates eine verzögerte Reaktion beobachtet werden. Es kann somit die Ausbildung einer an Zellen gebundenen, unabhängig von humoralen Antikörpern wirksamen Immunität gegenüber Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen angenommen werden. Die Übertragung von humoralen Antikörpern konnte durch dreimaliges Waschen der Spenderleukozyten in physiologischer Kochsalzlösung ausgeschlossen werden. Mit der vorliegenden Versuchsanordnung zeigte sich kein prinzipieller Unterschied zwischen der Sensibilisierung der Zellen durch Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen, sofern letzteres mehrmals zur Immunisierung appliziert wurde. Nach einmaliger Impfung mit Vakzine-Antigen ist die Intensität der Gewebereaktion geringer. Analoge Befunde konnte MAHNEL (1962) bei der Untersuchung der vakzinalen, humoralen Antikörperbildung gegenüber Vakzine-Antigen erheben. Spezielle Untersuchungen über Zusammenhänge der Dauer der Gewebeimmunität und ihrer Stärke wurden in den vorliegenden Versuchen nicht vorgenommen. Immerhin konnte eine Gewebeimmunität, die durch acht-malige Vakzine-Antigen-Impfungen hervorgerufen worden war, noch nach 61 Tagen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse, die bei der lokalen und generalisierten Übertragung der Gewebeimmunität gegenüber Vakzine-Virus erzielt wurden,

stimmen mit Beobachtungen von KEMPE (1960) an einem an Vaccinia gangraenosa erkrankten Kinde überein. Wie in der Einleitung (S. 6) beschrieben, konnte dieses Kind keine gewebliche und humorale Abwehr gegen das Vakzine-Virus entwickeln und es gelang KEMPE nicht durch intravenöse Injektion von Leukozyten und durch Transplantation von Lymphknoten von Vakzine-immunisierten Menschen bei diesem Kind eine generalisierte Hautsensibilisierung zu erreichen. Dagegen zeigte sich nach subcutaner Leukozyteninjektion in die umgrenzenden Hautstellen eine lokal begrenzte Gewebesensibilisierung mit der Fähigkeit der Gewebe den fortschreitenden vakzinalen Prozeß zum Stehen zu bringen. Die Frage, ob nach Austauschtransfusionen beim neugeborenen Menschen, bei denen ja in der Regel Blut von Vakzine-geimpften Erwachsenen verwendet wird, nicht doch eine generalisierte Reaktionsbereitschaft der Gewebe gegenüber Vakzine-Virus im Sinne einer allergischen Reaktion auftritt, wurde bisher nicht untersucht.

Die Prüfung der Reaktionsbereitschaft vom verzögerten Typ wurde in den vorliegenden Versuchen mit Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen mit Erfolg durchgeführt. Bei subcutaner Injektion von Vakzine-Antigen entsteht beim Nichtimmunen keine sichtbare Reaktion, wogegen bei vorliegender Hautsensibilisierung eine Rötung und eine Induration auftritt, die leicht nachgewiesen werden können. Die Induration allein ist typisch für die Gewebereaktion vom verzögerten Typ. Ähnliche Ergebnisse konnte EHRENGUT (1961 u. 1963) am Vakzine-immunen Menschen erheben; er injizierte formalinabgetötetes Vakzine-Virus mit Tuberculinspritzen intracutan und beobachtete die gewebliche Reaktion am Ort der Injektion. Diese Methode

hat sich nach EHRENGUT mit nur 4% Fehlergebnissen bewährt um die gewebliche Vakzine-Immunität auszutesten.

Die Cytolyseversuche liefen nur teilweise parallel zu den Übertragungsversuchen einer geweblichen Reaktionsbereitschaft. Ergänzend wurden außerdem Cytolyseversuche an Human- und Meerschweinchenleukozyten durchgeführt. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Cytolyse geeignet ist zu zeigen, ob eine Sensibilisierung der isolierten Leukozyten vorliegt und ob mit diesen Leukozyten überhaupt eine Übertragung der Gewebeallergie möglich ist. Die unterschiedliche Stärke der Reaktion bei Einwirkung von Vakzine-Virus auf die Humanleukozyten läßt darauf schließen, daß eine verschieden starke Sensibilisierung der Zellen gegen das Antigen vorgelegen hat. Diese ist um so größer, je kürzer der Zeitraum nach Abklingen einer positiven Impfreaktion (Pustelreaktion) mit Vakzine-Virus war (vgl. ENGELHARDT 1965).

Auffällig sind die unterschiedlichen Befunde bei der Zellveränderung. Grundsätzlich wurden sensibilisierte Kaninchen- und Humanleukozyten durch Vakzine-Virus schneller zerstört als Meerschweinchenleukozyten. Dabei können Zell- und Artunterschiede eine Rolle spielen (siehe auch MOEN und SWIFT 1936); zum anderen kann hier auch unterschiedliche Vorbehandlung der Leukozyten von Einfluß sein. Da die Meerschweinchenleukozyten aus Ascites gewonnen wurden, erübrigte sich eine Behandlung zur Trennung der Zellen wie es bei den aus Blut gewonnenen Leukozyten nötig war. Durch die Zentrifugation, den Zusatz gerinnungshemmender Mittel und durch das Waschen der Leukozyten kann eine gewisse Veränderung der Zellen, besonders ihrer Oberfläche zustande kommen; hierdurch kann angenommen werden, daß die Zellen dem Vakzine-Virus gegen-

über anfälliger sind. Möglicherweise müssen auch für das verstärkte Auftreten von Stechapfelformen bei den Human- und Kaninchenleukozyten, die sich auch teilweise bei den Kontrollen zeigten, Oberflächenveränderungen (Störungen der Grenzflächenspannungen, Veränderungen der Elektrolytpermeabilität) als Ursache angenommen werden. Der Einfluß von pH-Unterschieden durch das Nährmedium konnte ausgeschlossen werden, da Versuche ohne Nährmedium (TCM) ebenfalls zu Stechapfelformen führten und bei den Leukozyten einer nichtimmunen Spenderin (Patientin O.) keine Stechapfelformen auftraten, obwohl das gleiche Nährmedium für die Zellen anderer Versuche verwendet wurde. Fernerhin traten bei einer vakzine-immunen Versuchs-Person (S.20) nach anfänglicher Bildung von Schrumpfformen bei Reaktion der Zellen mit Vakzine-Antigen später blasige Strukturveränderungen der Zellen auf; dies deutet mehr auf eine spezifische, als auf eine unspezifisch-artifizielle Veränderung der Zellen hin, etwa im Sinne des von der Tuberkulose bekannten "Rich Phänomens" (RICH u. LEWIS 1928 u. 1932).

Obwohl der Nachweis einer Sensibilisierung von Zellen, die von Vakzine-Antigen-immunisierten Kaninchen stammten, durch Lysisreaktion nach Kontakt mit Vakzine-Virus möglich war, konnte eine Cytolyse durch Vakzine-Antigen nicht nachgewiesen werden. Bei den sensibilisierten Zellen trat nach Vakzine-Antigen-Kontakt wohl eine etwas stärkere Schrumpfung als bei den Zellen unbehandelter Tiere auf, jedoch war dieser Unterschied nicht ausreichend genug, um einen cytopathogenen Effekt durch Vakzine-Antigen zu begründen. Die Tatsache, daß Vakzine-Antigen, das im vorliegenden Fall selbst das induzierende Antigen war, zu keiner Lyse führte,

zeigt erneut (s. a. MAHNEL 1962, STICKL, MUNZ und VANEK 1964), daß es in seinen antigenen Eigenschaften eingeschränkt ist. Die um 4% liegende Versagerquote bei der Hautaustestung einer vakzinalen Allergie mit Vakzine-Antigen (EHRENGUT 1961 u. 1963) findet hierin ihre Erklärung.

GILLISSEN berichtete 1964 von seinen Beobachtungen an Zellen tuberkulöser Tiere, bei denen er mit Tuberculoprotein (PPD) bei sensibilisierten Zellen keine Lyse hervorrufen konnte, bzw. wo es erst zu einer Lyse kam, nachdem Komplement (C'_3) hinzugefügt worden war. Er unterscheidet daher an der Oberfläche von Tuberkulose-sensibilisierten Zellen zweierlei Receptoren: einen PPD-affinen Receptor, der zur Reaktion Komplement benötigt, und einen "OT" (Alttuberkulin)-affinen, der für die Reaktion mit dem entsprechenden Prüfagens kein Komplement gebraucht.

Dieses Ergebnis ist auch für die genannten Versuche mit Vakzine-Antigen von Interesse, wonach offenbar die Veränderung der antigenen Struktur - hier die formalinbedingte Fällung von Proteiden-- die Lyse von sensibilisierten Zellen bei Kontakt mit diesem denaturierten Antigen unmöglich macht. Die Sensibilisierung von Zellen Vakzine-Virus-immuner Kaninchen konnte durch Cytolyse bei Kontakt mit Vakzine-Virus nachgewiesen werden, nicht aber nach Reaktion mit Vakzine-Antigen. Andererseits war es möglich, die Prüfung der Allergisierung des Gewebes nach lokaler Übertragung vakzine-sensibilisierter Zellen mit Vakzine-Antigen durchzuführen. Es ist immerhin möglich, daß der passive Transfer der vakzinalen Allergie nur unter Mitwirkung von Komplement des Empfängertieres durch Vakzine-Antigen nachweisbar wird. Eine solche Komplementreaktion ist bei den Cytolyseversuchen in vitro ausgeschlossen, wodurch sich das

Fehlen der Cytolyse nach Vakzine-Antigen-Kontakt erklären ließe. Trotzdem bleibt die Frage offen, wieso das Vakzine-Antigen in der Lage ist, Zellveränderungen (Allergisierung) hervorzurufen, die in vitro nur mit dem Vakzine-Virus, nicht aber mit dem als Induktor verwendeten Vakzine-Antigen in den Cytolyseversuchen nachgewiesen werden können. In diesem Zusammenhang soll auf Beobachtungen von ROTHER hingewiesen werden, der feststellte, daß sich bei tuberkulösen Tieren mit Komplementdefekt (besonders ohne 3. Komponente des C') keine Überempfindlichkeit gegenüber Tuberculin zeigte. Dies würde bedeuten, daß Komplement schon bei der Ausbildung der Gewebeimmunität eine Rolle spielt, und sich die Zellsensibilisierung in einem größeren Ausmaß entwickelte, als der antigenen Struktur des formalin-inaktivierten Vakzine-Antigen entsprechen würde.

NISHMI und BERNKOPF (1958) beobachteten einen cytopathogenen Effekt von Vakzine-Virus auf Mäuseperitonealexsudatzellen und Humanleukozyten, der in Vakuolisation, Granulation, Verklumpung und Auflösung der Zellen bestand. Dabei handelte es sich um Zellen von Vakzine-unbehandelten Mäusen; es bleibt jedoch offen, ob es sich um einen Ektromelie-Virus-freien Mäusestamm handelte. Ob die Humanleukozyten von Vakzine-geimpften Personen stammten, wird nicht angegeben. Bei dem Vergleich der Ergebnisse, - nach 48 Stunden sind von 100 Mäusezellen nach Vakzine-Virus-Einwirkung noch 4 (bei der Kontrolle ohne Virus 67) Zellen mobil, was 5% der möglichen Zellen im Vergleich mit den Kontrollen ausmacht, - liegt die Vermutung nahe, daß es sich bei den Humanleukozyten um Zellen

Vakzine-immuner Personen gehandelt hat, zumal in Israel, wo die Versuche durchgeführt wurden, eine strenge Impfpflicht besteht. Bei den Humanleukozyten kann also eine Immuncytolyse angenommen werden. Obgleich nämlich Mäuseperitonealzellen allgemein eine größere Empfindlichkeit zeigen (nur noch 21 Zellen von 100 bei den Kontrollen intakt), ist offenbar die Empfindlichkeit gegen Vakzine-Virus nicht so ausgeprägt. Da die meisten Mäusezuchtereien mit Ektromelie-Virus verseucht sind, muß angenommen werden, daß die Verseuchung der verwendeten Versuchsmäuse vorlag, zumal der Hinweis einer Verwendung der seltenen Ektromelie-Virusfreien Versuchsmäuse (z. B. sogenannte "Rockefeller-Mäuse") fehlte. Die Antigengemeinschaft des Ektromelie-Virus mit dem Vakzine-Virus drückt sich in der beobachteten Cytolyse aus. Faßt man die Versuche von NISHMI und BERNKOPF mit Leukozyten vom Menschen und Makrophagen der Maus zusammen, so ergibt sich, daß die Deutung über die direkte Wirkung eines „Virustoxins" auf die Zellen nicht stichhaltig ist, da es sich hier offenkundig um gewegsallergische Phänomene gehandelt hatte. Die Ergebnisse von NISHMI und BERNKOPF, die Zerstörung von Mäusezellen durch Vakzine-Virus als Ausdruck einer unspezifischen Toxinität des Virus, konnten dementsprechend in den hier vorliegenden Versuchen an Kaninchenleukozyten nicht bestätigt werden : Vakzine-Virus bewirkte bei den nichtsensibilisierten Zellen keine Lyse.

In Virusadsorptionsversuchen an Leukozyten konnte festgestellt werden, daß Zellen von Kaninchen, die mit Vakzine-Virus oder Vakzine-Antigen sensibilisiert waren, offenbar mehr Vakzine-Virus gebunden haben als die Zellen von unbehandelten Tieren. Jedoch betrug bei den Hämaggluti-

nationstesten der Titerunterschied nur 1 - 2 Stufen. Dadurch erhalten die Ergebnisse nur einen hinweisenden, nicht aber beweisenden Charakter. Sie stimmen aber mit denen von GILLISSEN (1964) überein. Zellen tuberculöser Tiere konnten mehr Alttuberkulin binden als Zellen von Tuberculin-negativen Tieren. Es darf daher trotz der genannten Einschränkung angenommen werden, daß auch bei der allergischen Hautreaktion Vakzine-Virus verstärkt an die sensibilisierten Zellen gebunden wird und mit diesen reagiert.

V. Zusammenfassung

Es wurden Versuche zur passiven Übertragung der Gewebeimmunität, bzw. Gewebeallergie gegenüber Vakzine-Virus und Vakzine-Antigen auf nichtsensibilisierte Kaninchen mit weißen Blutzellen von Vakzine-immunen Spendertieren durchgeführt. Dabei konnten die folgenden Ergebnisse gewonnen werden :

1. Bei Kaninchen gelang die passive Übertragung einer lokalen vakzinalen geweblichen Reaktionsbereitschaft (s. Kap. III B), nicht dagegen die einer generalisierten (s. Kap. III A).
2. Die Übertragung der Gewebeallergie gelang sowohl mit Leukozyten von Spendertieren, die mit Vakzine-Virus geimpft, als auch mit solchen, die durch mehrfache Applikation von Vakzine-Antigen sensibilisiert worden waren.
3. Der Nachweis der Gewebesensibilisierung nach lokalem zellulären Transfer war durch Vakzine-Virus und auch durch Vakzine-Antigen möglich.
4. Eine Cytolyse von Zellen vakzine-immuner Kaninchen und Menschen konnte nur gegenüber Vakzine-Virus, nicht aber gegenüber Vakzine-Antigen nachgewiesen werden.
   Die Versuche von NISHMI und BERNKOPF (1958) zum „Virustoxin" des Vakzine-Virus werden anhand der eigenen Versuche überprüft und kritisch diskutiert.
5. Es konnte wahrscheinlich gemacht werden, daß isolierte Leukozyten von Virus- und Vakzine-Antigen-immunisierten Kaninchen in vitro

Vakzine-Virus adsorbieren, nicht jedoch Zellen von unbehandelten Tieren.

6. Zustandekommen und Bedeutung der Ergebnisse werden diskutiert.

VI. Literaturverzeichnis

1. Bassermann, F. H.: Vergleichende licht- und elektronenoptische Untersuchungen zur experimentellen Tuberkulinleukolyse. Beitr. klin. Tbk. 112; 409, 1954.

2. Chase, M. W.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59; 134, 1945.

3. Ehrengut, W.: Über den Nachweis der vaccinalen Allergie mit formalininaktiviertem Vaccinevirus bei narbenlosen Wiederimpflingen. Dtsch. med. Wschr. 86; 264, 1961.

4. Ehrengut, W.: Die Prüfung der Allergie- und Immunitätslage des Wiederimpflings mit inaktiviertem bzw. aktivem Vakzinevirus. Die mediz. Welt 1963, 235.

4a. Engelhardt, J.: Dissertation. Köln 1965.

5. Favour, C. B.: Lytic effect of bacterial products on lymphocytes of tuberculosis animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 65; 269, 1947.

6. Favour, C. B., P. Fremont-Smith, and J. M. Miller: Factors affecting the in vitro cytolysis of white blood cells by tuberculin. Amer. Rev. Tuberc. 60; 212, 1949.

7. Favour, C. B., B. A. Harrison, and C. K. Osgood: Increased in vitro tuberculin leucocyte cytolysis following a tuberculin skin test. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 73; 122, 1950.

8. Fremont-Smith, P., and C. B. Favour: In vitro lysis of leucocytes from tuberculous humans by tuberculoprotein. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 67; 502, 1948.

9. Gell, P. G. H., and B. Benacerraf: Delayed hypersensitivity to simple proteins antigens. Advances in Immunology, 1; 319, 1961.

10. Gillissen, G.: Delayed type hypersensitivity. Symposium in Davos, March, 31, 1964 - April, 3, 1964.

11. Günther, O.: Die Ontogenese der Immunität. Vortrag im 140. Kolloquium des Paul-Ehrlich-Institutes zu Frankfurt am Main, am 26. 5. 1964.

12. Heilman, D. H.: Tissue culture methods for studying delayed allergy. A review. Texas Reports on Biology and Medicine 21; 136, 1963.

13. Herrlich, A.: Über Vakzine-Antigen. Münch. med. Wschr. 101; 12, 1959.

14. Herrlich, A.: Handbuch der Schutzimpfungen. Springer-Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg 1965 (im Druck).

15. Herzberg, K.: Vergleichende Vaccinevirusuntersuchungen. Zbl. Bakt. Paras. I. Abt. Orig. 162; 408, 1955.

16. Jenner, E.: An Inquiry into the causes and effects of the Variolae Vaccinae a disease discovered in some of the western countries of England particularly Gloucestershire, and known by the name of The cow-pox. London, Sampson Law 1798.

17. Kabat, E. A., and M. M. Mayer: Experimental Immunochemistry, Second Edition. Charles C. Thomas, Springfield Illinois, USA. 1961.

18. Kempe, C. H.: Studies on smallpox and complications of smallpox vaccination. E. mead Johnson award address. Pediatrics, 26; 176, 1960.

19. Landsteiner, K., and M. W. Chase: Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49; 688, 1942.

20. Lawrence, H. S.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 71; 516, 1949.

21. Lawrence, H. S.: The transfer in humans of delayed skin sensitivity to streptococcal M substance and to tuberculin with disrupted leucocytes. J. Clin. Invest. 34; 219, 1955.

22. Lawrence, H. S.: Cellular and humoral aspects of hypersensitivity states. Hoeber, New York, 1959.

23. Mahnel, H.: Tierexperimentelle Untersuchungen mit Vakzine-Antigen. Arch. ges. Virusfrsch. 10; 529, 1960.

24. Mahnel, H.: Tierexperimentelle Arbeiten mit Vakzine-Antigen. Arch. ges. Virusfrsch. 11; 658, 1962.

25. Mayr, A.: Experimentelle Arbeiten über das hämagglutinierende Prinzip bei Tierpockenviren. Arch. ges. Virusfrsch. 6; 439, 1956.

26. Mayr, A., und E. Munz: Das Vakzine-Virus. In Herrlich, A. Handbuch der Schutzimpfungen, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, Göttingen, 1965 (im Druck).

27. Menkin, V.: Studies on inflammation; mechanism of increased capillary permeability. J. Exp. Med. 64; 485, 1936.

28. Nishmi, M., and M. Bernkopf: The toxic effect of vaccinia virus on leucocytes in vitro. J. Immunol. 81; 460, 1958.

29. Nowell, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. Cancer Research, 20; 462, 1960.

30. Von Pirquet, C.: Klinische Studien über Vakzination und vakzinale Allergie. Franz Deuticke, Leipzig und Wien 1907.

31. Rich, A.R., and M.R. Lewis: Mechanisms of allergy in tuberculosis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 25; 596, 1927.

32. Rich, A.R., and M.R. Lewis: The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies. Bull. Johns Hopkins Hosp. 50; 115, 1932.

33. Rössle, R.: Allergie und Pathergie. Klin. Wschr. 1933, 574.

34. Rother, zitiert nach G. Gillissen : Delayed type hypersensitivity. Symposium in Davos, March, 31, 1964 - April, 3, 1964.

35. Stickl, O., und W. Knapp: in H. Deist und H. Krauss: Die Tuberkulose, Ihre Erkennung und Behandlung. F. Enke, Stuttgart 1959.

36. Stickl, H., E. Munz, und E. Vanek: Versuche über die Antigenität inaktivierter Pockenschutzimpfstoffe. Zschr. f. Hygiene, 150; 114, 1964.

37. Waksman, B.H.: Studies on cellular lysis in tuberculin sensitivity. Amer. Rev. Tuberc. 68; 746, 1953.

Lebenslauf.

Am 14. 1. 1940 wurde ich als erstes Kind des Attachés Dr. Franz Quadflieg und seiner Ehefrau Dipl. Volkswirtin Erika Q. in Halberstadt geboren. Von 1946 bis 1954 besuchte ich die Volksschule, danach die Oberschule (Realgymnasium) in Halberstadt, wo ich 1958 das Abitur ablegte. Es folgten 3 Monate Arbeit als Praktikantin an der Universitätsbibliothek Leipzig und 1/4 Jahr in einem Kindergarten in West-Berlin. Von Frühjahr 1959 bis Herbst 1959 absolvierte ich in Gießen den Vorbereitungskurs für die Sonderprüfung für Abiturienten aus Mitteldeutschland. Im Wintersemester 1959/60 begann ich mit dem Medizinstudium in Gießen, legte daselbst 1960 das Vorphysikum und Ende des Wintersemesters 1961/62 das Physikum ab. Seit dem Sommersemester 1962 studierte ich in München, wo ich am 20. Februar 1967 das Medizinstudium mit dem Staatsexamen abschloß.

Seit Dezember 1964 bin ich mit dem wissenschaftlichen Assistenten am Ostasiatischen Seminar Dr. Rolf Trauzettel verheiratet.

Dem Direktor der Bayerischen Landesimpfanstalt, Herrn Prof. Dr. A. Herrlich, möchte ich hier meinen Dank für die Arbeitsmöglichkeit, die er mir an seinem Institut gewährt hat, aussprechen. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. H. Stickl, Bayerische Landesimpfanstalt, für das Thema der Arbeit sowie seine Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.